

**Universitat de Lleida**

FACULTAD DE MEDICINA

Grado en Nutrición Humana y Dietética

Trabajo de Fin de Grado

**FERMENTACIÓN COLÓNICA *IN VITRO*  
DE COMPUESTOS FENÓLICOS  
PRESENTES EN EL ACEITE DE OLIVA**

Alumna: Sara Puy Torres

Tutora: María José Motilva Casado

Cotutora: Juana Mosele

Lleida, septiembre 2013



# Índice

1. Lista de abreviaturas	1
2. Resumen	2
3. Introducción	3
3.1 Dieta Mediterránea	3
3.2 Aceite de oliva virgen	4
3.3 Absorción, metabolismo y excreción de los compuestos fenólicos del aceite de oliva	6
3.4 Microbiota colónica	9
3.5 Fermentación colónica <i>in vitro</i>	10
4. Hipótesis	11
5. Objetivos de la investigación	12
6. Materiales y métodos	13
6.1 Diseño del estudio	13
6.2 Material	14
6.3 Procedimiento	14
7. Resultados	18
8. Discusión	31
9. Conclusión	34
10. Bibliografía	35
11. Anexos	40

## 1. LISTA DE ABREVIATURAS

3 OHPPA	Ácido 3- hidroxifenilpropiónico
3- PPA	Ácido 3-fenilpropiónico
3,4 diOHPPA	Ácido 3,4- dihidroxifenilacético
3,4-EA	3,4- dihidroxifeniletanol unido al ácido elenoico
3,4-EDA	3,4- dihidroxifeniletanol unido a la forma dialdehídica del ácido elenoico.
4-HEA-EA	4- hidroxietanol unido al ácido elenoico
AOV	Aceite de oliva virgen
CA	Ácido cafeico
EA	Ácido elenoico
FA	Ácido ferúlico
GA	Ácido gálico
HVA	Ácido homovainillínico
<i>m</i> - OHPPA	Ácido meta-hidroxifenilacético
<i>o</i> - CMA	Ácido orto-cumárico
<i>o</i> - OHPPA	Ácido orto-hidroxifenilacético
OHPPA	Ácido hidroxifenilpropiónico
OHT	Hidroxitirosol
OHT-ac	Hidroxitirosol acetato
OL	Oleuropeína
PAA	Ácido fenilacético
PCA	Ácido protocatecuico
<i>p</i> - CMA	Ácido para-cumárico
<i>p</i> - OHBA	Ácido para-hidroxibenzoico
<i>p</i> -OHPPA	Ácido para-hidroxifenilacético
<i>p</i> -OHPPA	Ácido para-hidroxifenilpropiónico
TYR	Tirosol
UPLC-ESI-MS/MS	Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas en tándem

## 2. RESUMEN

**Antecedentes:** la fermentación colónica *in vitro* ha sido ampliamente utilizada para identificar los compuestos fenólicos procedentes del metabolismo microbiano. A pesar de que este modelo no reproduce idénticamente las condiciones *in vivo* del colon, proporciona valiosa información sobre el comportamiento de los compuestos para así facilitar su posterior aplicación en estudios *in vivo*. La identificación y cuantificación de los metabolitos microbianos producidos en el intestino grueso son de gran importancia en el contexto de la biodisponibilidad y de los efectos potencialmente beneficiosos de estos compuestos procedentes de la dieta

**Objetivo:** el propósito de este estudio fue esclarecer la posible ruta metabólica de los compuestos fenólicos del aceite de oliva tirosol (TYR), hidroxitirosol (OHT), hidroxitirosol acetato (OHT-ac) y oleuropeína (OL) en el colon, siguiendo un modelo de fermentación colónica *in vitro*.

**Diseño:** los compuestos fenólicos TYR, OHT, OHT-ac y OL fueron sometidos a una fermentación colónica *in vitro* utilizando muestras fecales de tres voluntarios sanos. La formación de metabólica tanto cualitativa como cuantitativa fue monitorizada en los tiempos 0, 2, 6, 12, 24 y 48h de incubación.

**Resultados:** TYR e OHT presentaron el mayor índice de degradación en las primeras 6 h de fermentación y una aparente estabilidad hasta el fin del proceso de incubación. OHT-ac y OL fueron rápidamente degradados. OHT-ac produjo OHT como principal metabolito resultado de la hidrólisis de la molécula en el medio de fermentación. OL fue prácticamente degradada después de 12 h de incubación y dio como principal producto de su catálisis OHT, OHT-ac, ácido elenoico (EA) y 3,4-dihidroxifeniletanol unido al ácido elenoico (3,4-EA). Las posibles rutas metabólicas de la degradación de los compuestos fenólicos han sido propuestas a partir de los análisis realizados.

**Conclusión:** la concentración de TYR e OHT permanecen estables tras sufrir una parcial degradación durante las primeras horas de incubación. OHT-ac y OL liberaron OHT como principal producto de degradación microbiana durante las primeras horas de incubación. La presencia de OHT y otros metabolitos colónicos en heces podría jugar un importante papel en la prevención local de enfermedades del colon.

### **3. INTRODUCCIÓN**

#### **3.1 Dieta Mediterránea**

En el año 2010, el Comité Intergubernamental de la UNESCO para la Salvaguardia del Patrimonio Cultural Inmaterial, en la reunión que se celebró en Nairobi (Kenia), acordó incluir la Dieta Mediterránea (DM) en la Lista Representativa del Patrimonio Cultural Inmaterial de la Humanidad. Esta dieta, reconocida como un inmenso patrimonio cultural, milenario, evolutivo y dinámico, se encuentra amenazada por el avance casi irrefrenable de otros patrones dietéticos, sobre todo occidentales, que paulatinamente se van instaurando en la actual sociedad Mediterránea. Justamente, dicho reconocimiento internacional pretende proteger el inmenso valor inmaterial de la DM. La candidatura fue elaborada y presentada conjuntamente por los gobiernos de Grecia, Italia, Marruecos y España, y fue coordinada a nivel técnico por la Fundación Dieta Mediterránea [1].

Se trata de un patrón alimentario característico de los territorios pertenecientes a la cuenca del Mediterráneo. Esta dieta se caracteriza por un elevado consumo de alimentos de origen vegetal como frutas, verduras, hortalizas, cereales y derivados, legumbres y frutos secos; por un consumo moderado de pescado, marisco, carne de ave, productos lácteos y huevos; y un consumo bajo de carnes rojas y alimentos procesados. Cabe destacar el uso del aceite de oliva como principal fuente de grasa y el consumo de vino durante las comidas (opcional). Dentro de este patrón alimentario también tiene lugar la utilización de hierbas aromáticas para enriquecer los platos, como son el laurel, el perejil, el tomillo o la albahaca [2]. La combinación de todos estos alimentos proporciona de forma equilibrada los nutrientes necesarios para el organismo.

Durante las últimas décadas varias investigaciones científicas han revelado que la DM podría ser responsable de ciertos efectos beneficiosos sobre la salud. De manera general, la adhesión a esta dieta estaría asociada a un efecto protector sobre la aparición de diferentes enfermedades crónicas degenerativas así como también a una mejor calidad de vida y envejecimiento.

Más concretamente, la principal vinculación de este patrón dietético es sobre la incidencia de enfermedades cardiovasculares, ya que existen numerosos estudios que ponen de manifiesto la protección que ejerce sobre la aparición de este tipo de patologías [3,4]. Aun así, en los últimos años se ha observado un creciente interés por parte de la comunidad científica en ampliar el conocimiento sobre los posibles agentes responsables de los efectos

beneficiosos llegándose a centrar en una asociación inversa entre la adherencia a la DM y la aparición de diversos tipos de cáncer, como sería el de colon [5,6].

### **3.2 Aceite de oliva virgen**

Uno de los pilares fundamentales de la DM es el consumo de aceite de oliva como principal fuente de grasa. El aceite de oliva virgen (AOV) es el producto que se obtiene de la aceituna mediante un método de prensado en frío, sin empleo de productos químicos ni elevadas temperaturas gracias a lo cual se consiguen conservar muchos compuestos bioactivos que no se encuentran, o están presentes en muy bajas cantidades, en los aceites refinados de oliva u otros productos oleaginosos.

Dentro de su composición química, este alimento está constituido por dos fracciones, la saponificable o glicérida y la insaponificable o no glicérida. La primera de ellas contiene la mayoría de los ácidos grasos con un gran porcentaje de ácidos grasos monoinsaturados, como el ácido oleico. Es la fracción no saponificable la que incluye componentes minoritarios como esteroides, pigmentos, compuestos fenólicos y volátiles [7].

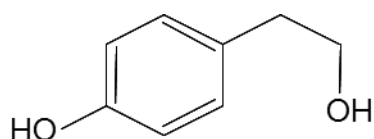
El consumo del AOV podría estar detrás de algunos de los efectos positivos que se atribuyen a la DM. Se ha podido comprobar, mediante estudios nutricionales y epidemiológicos, que su ingesta estaría relacionada con algunos beneficios biológicos a nivel de estrés oxidativo, a nivel lipídico y antiinflamatorio entre otros [8,9].

La explicación de tales beneficios recae en la presencia de los componentes minoritarios anteriormente mencionados. No sólo el contenido en ácidos grasos monoinsaturados sería el responsable de los efectos positivos sino que también los compuestos fenólicos jugarían un papel fundamental, dando lugar a un efecto sinérgico. Esta fracción minoritaria está representada por diversos compuestos de naturaleza fenólica en la que se han descrito alrededor de 36 sustancias diferentes. Factores ambientales (clima, suelo, variedad y grado de madurez del fruto, etc.) y tecnológicos (conservación, tecnología de procesamiento, etc.) son los responsables de la variación cuantitativa de dichos compuestos en el AOV [9].

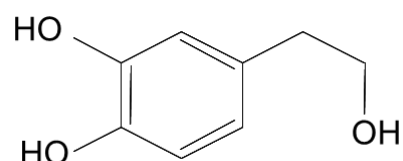
En el AOV, la fracción fenólica se puede clasificar en fenoles simples y complejos:

- Fenoles simples
  - Alcoholes fenólicos: TYR (Figura 1), OHT (Figura 2), OHT-ac (Figura 3).
  - Flavonoides: apigenina y luteolina

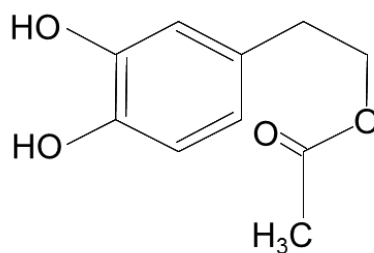
- Otros: ácido homovainillínico (HMV), *p*-cumárico,
- Complejos
  - Secoiridoides: OL (Figura 4) (OHT + EA + glucosa) y ligstrósido (TYR + EA + glucosa) y sus agliconas: OL aglicona (3,4-EDA y 3,4-EA) y ligstrósido aglicona (4-HEA- EA).
  - Ligananos (pinoresinol y acetoxipinoresinol)



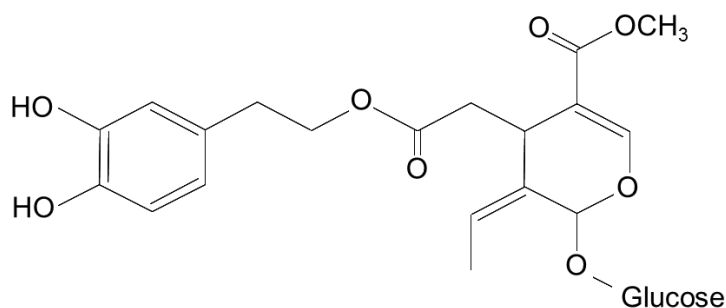
**Figura 1.** Estructura molecular del TYR.



**Figura 2.** Estructura molecular del OHT.



**Figura 3.** Estructura molecular del OHT-ac.



**Figura 4.** Estructura molecular de la OL.

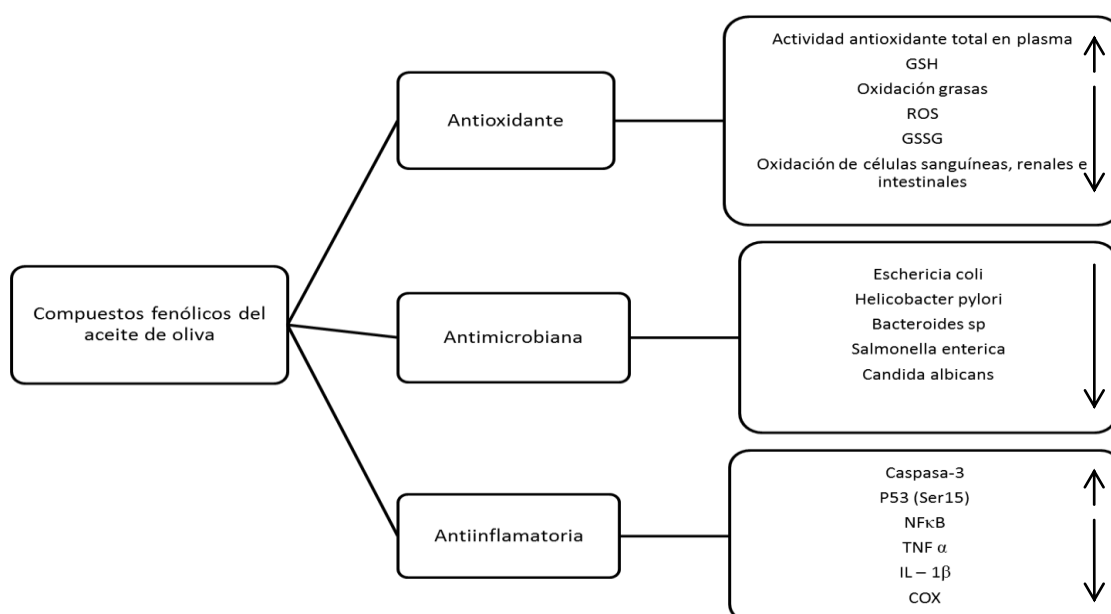


### 3.3 Absorción, metabolismo y excreción de los compuestos fenólicos del aceite de oliva

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios que se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal y comprenden aproximadamente unos 8000 compuestos diferentes. Todos ellos poseen una estructura común: un anillo aromático que contiene al menos un grupo hidroxilo. Normalmente no se encuentran libres si no que pueden estar conjugados con ácidos orgánicos y azúcares unidos al grupo hidroxilo. Se clasifican en dos grandes grupos: flavonoides y no flavonoides [10].

En el caso del aceite de oliva los polifenoles más abundantes: TYR, OHT, OHT-ac y OL aglicona pertenecen al grupo de no flavonoides. Estos se caracterizan por tener propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, anticancerígenas y antimicrobianas entre otras (Figura 5) [7,9, 11].

La ingesta de aceite de oliva en los países Mediterráneos se calcula en torno a los 30-50g/día. La concentración de fenoles en el AOV, como bien se ha comentado en el apartado anterior, varía en función de varios factores pudiendo oscilar entre 80-800mg de polifenoles por kg de aceite. Si tenemos en cuenta una concentración media de 500mg/kg, el consumo diario de polifenoles aportados por el aceite de oliva sería aproximadamente entre 15-25mg/día [12].



**Figura 5.** Propiedades de los compuestos fenólicos del aceite de oliva (adaptado de *Cicerale et al.* [11])

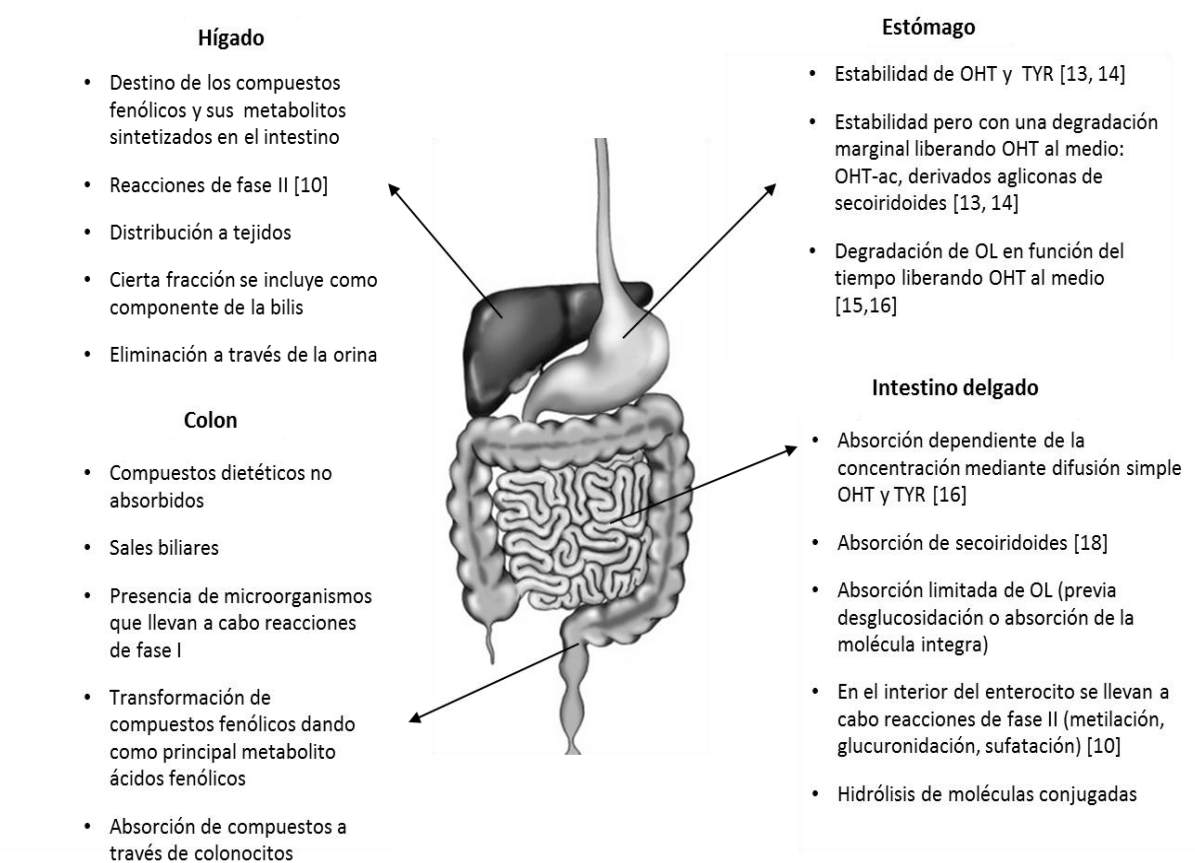
Las propiedades bioactivas de los polifenoles del aceite de oliva y su capacidad de llevar a cabo acciones biológicas en el organismo dependen de su biodisponibilidad que se conoce mediante el estudio de los mecanismos de absorción, distribución y metabolismo de dichos compuestos.

Una vez que los compuestos fenólicos son ingeridos llegan al estómago donde el pH ácido (aprox. 2) puede afectar su estabilidad y, por lo tanto, modificar su acción biológica. Dependiendo del tipo de compuesto el ambiente ácido del estómago puede afectar más o menos a la estabilidad de la molécula. En el caso del TYR e OHT la modificación a nivel gástrico es mínima, exceptuando el OHT-ac, el cual es hidrolizado ligeramente dando lugar a OHT libre [13,14]. En el caso de los secoiridoides existen diferencias según se trate de la forma aglicona o glucosídica. Las condiciones ácidas del estómago podrían afectar la integridad de la oleuropeína aglicona, pese a ello, los resultados obtenidos de estudios *in vitro* difieren según los autores. Mientras que unos concluyen que la OL aglicona no sufre modificaciones en el ambiente gástrico [14] otros, sin embargo, ponen de manifiesto que se produce una degradación en función del tiempo de permanencia, contribuyendo a un aumento del OHT libre [15,16]. Con respecto a la estabilidad gástrica de la OL, los resultados también son contradictorios. En un estudio *in vitro* se ha observado que la OL se mantiene estable en una solución a pH2 [16]. Sin embargo, en otro experimento, la OL se degradó parcialmente al mismo pH pero permaneció estable a pH entre 3 y 6.5 [17]. Los autores de este último estudio sugieren que la hidrólisis de la OL se ve condicionada por la ingesta de otros alimentos. El pH del estómago llega a 3 en presencia de alimentos mientras que se mantiene en 2 cuando la OL se ingiere en ayunas (por ejemplo, cuando se consume como suplemento dietético).

El grado de hidrólisis que las formas conjugadas OL, ligstrósido y sus agliconas sufren a nivel gástrico puede condicionar la presencia de compuestos simples en el intestino delgado que es, justamente, el lugar donde se produce, en mayor medida, el proceso de absorción de la gran mayoría de los nutrientes. El TYR e OHT son absorbidos de forma rápida en función de la dosis, es decir, a mayor concentración de estos compuestos en el lumen, mayor absorción [18]. El OHT-ac ha sido detectado en orina, lo que demuestra que puede ser absorbido sin previa modificación [19]. La OL y su forma aglicona también pueden atravesar la barrera intestinal sin sufrir modificaciones pero en menor medida que los alcoholes fenólicos antes mencionados [15]. Varios autores coinciden en el hecho de que el mayor aprovechamiento de las formas complejas OL y su aglicona se debe a liberación de OHT en el lumen o bien dentro de los enterocitos como consecuencia de una previa hidrólisis de la molécula.

Tras la absorción, estos compuestos sufren metabolismo de fase II en el interior de los enterocitos y en el hígado, donde se llevan a cabo reacciones enzimáticas de metilación, glucuronización y/o sulfatación. Desde el hígado son transportados, a través del torrente sanguíneo, a diversos órganos y/o tejidos [10]. A este nivel es donde podrían ejercer su efecto protector antes de ser excretados por vía urinaria. Parte de los metabolitos formados en hígado vuelven al lumen intestinal por recirculación enterohepática.

Aunque se ha descrito al intestino delgado (yeyuno e íleo) como la principal vía de entrada de la mayoría de los compuestos fenólicos no hay que descartar la presencia de parte de ellos en el colon donde pueden desarrollarse procesos de fermentación por acción de la microbiota local dando lugar a metabolitos de bajo peso molecular, sobre todo ácidos fenólicos [10].



**Figura 6.** Esquema de la ruta de los compuestos fenólicos presentes en el aceite de oliva en el organismo.

### 3.4 Microbiota colónica

La población microbiana localizada en el intestino humano es una compleja comunidad de aproximadamente un trillón de células bacterianas y arqueanas, las cuales están distribuidas en más de 1000 especies, en su mayoría anaerobias. Esta comunidad está compuesta principalmente por cinco filos bacterianos: Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Proteobacteria y Verrucomicrobia y una Archaea: Euriarchaeota. De entre todos los grupos bacterianos, un 90% pertenecen a las especies Firmicutes y Bacteroidetes [20].

La función inmunológica, nutricional y el desarrollo del organismo están relacionados con la población bacteriana colónica, pudiéndose considerar esta microflora intestinal como un órgano capaz de realizar numerosas conversiones bioquímicas debido a su versatilidad metabólica [20,21]. Estos microorganismos obtienen energía a partir de la fermentación de los componentes dietéticos que no han sido absorbidos en la parte superior del tracto digestivo. Como resultado de la fermentación colónica se obtienen compuestos de distinta naturaleza, tanto beneficiosos como perjudiciales para el organismo hospedador (huésped). Dentro de la gran diversidad microbiana hay bacterias perjudiciales y beneficiosas. Las primeras están asociadas al desarrollo de enfermedades y/o síntesis de sustancias nocivas mientras que las segundas ejercen su función protectora como resultado de la síntesis de compuestos bioactivos y/o limitando el crecimiento de bacterias perjudiciales. La estrategia, claro está, está en promover el crecimiento de estas últimas.

Numerosos factores contribuyen a la diversidad microbiana del colon; factores propios de la persona como las secreciones gástricas o la bilis, el peristaltismo y el tiempo de tránsito intestinal y/o el genotipo junto con factores ambientales, sobre todo dietéticos, como los componentes de la dieta, la ingestión de probióticos y prebióticos, la estructura y viscosidad de la comida y/o la presencia de tóxicos [22].

En esta sección del tubo digestivo, los compuestos fenólicos así como los intermediarios o los productos finales pueden directa, o indirectamente causar estrés o estimulación sobre determinados microorganismos; también la conversión microbiana de los compuestos fenólicos puede afectar vías colónicas o procesos de generación de ácidos grasos de cadena corta o disposición de hidrógeno [21].

### **3.5 Fermentación colónica *in vitro***

Una de las estrategias más empleadas para el estudio de la actividad microbiana a nivel del colon es la experimentación con modelos de fermentación colónica *in vitro*. Los modelos de fermentación *in vitro* poseen características que le proporcionan ventajas frente a los modelos *in vivo*. La mayor de sus ventajas recae en la capacidad experimental prácticamente ilimitada puesto que esta desvinculada a factores éticos. La versatilidad del diseño experimental también es mayor en este tipo de investigaciones junto con un ahorro de tiempo y un menor coste económico. Por último, este tipo de modelos permiten la utilización de material biológico humano y evitan interferencias en la respuesta del organismo.

Sin embargo, no todo son ventajas, los resultados de los modelos *in vitro*, en ocasiones, suelen ser difíciles de interpretar y de ser extrapolados a la población. No sustituyen del todo a los ensayos *in vivo* y por lo tanto es necesario combinar ambos modelos, en la medida de lo posible, para obtener resultados más válidos.

## 4 HIPÓTESIS

Los compuestos fenólicos están relacionados con numerosos beneficios sobre la salud, pero poca es la información disponible acerca de cuáles son los mecanismos concretos de actuación.

En los últimos años se ha observado un creciente interés por conocer el comportamiento de sustancias bioactivas (antocianidinas, flavanoides, estilvenos, lignanos, isoflavonas, etc.) a nivel del colon, pero una pequeña parte de estas se ha decantado por la investigación de los polifenoles del aceite de oliva. Por otro lado, el creciente interés sobre las transformaciones que se llevan a cabo en el organismo, en el tracto gastrointestinal concretamente, pone de manifiesto la necesidad de más investigaciones en ese campo.

En este trabajo se plantea la hipótesis de que a nivel del tracto digestivo inferior, en el colon, los compuestos fenólicos resultantes de la ingestión del aceite de oliva como el TYR, OHT, OHT-ac y OL que no han sido metabolizados en la sección proximal del tracto digestivo y/o excretados, son sometidos a la acción de la microflora colónica bajo un proceso de fermentación, dando lugar a diversos compuestos derivados que son el resultado de diferentes reacciones de transformación. Estos compuestos resultantes pueden ser sustancias parcialmente bioactivas con efectos beneficiosos bien a nivel local, ayudando a la prevención de enfermedades intestinales o bien, previa absorción, pueden ejercer su efecto en otros tejidos y órganos. Además, en la actualidad, existe evidencia de que los colonocitos tienen la capacidad de absorber estos compuestos derivados de la fermentación, puesto que han sido detectados en orina.

Por lo tanto, mediante el desarrollo de un experimento de fermentación colónica *in vitro*, el cual busca conocer la ruta metabólica que los compuestos fenólicos del aceite de oliva sufren a nivel del colon, se pretende identificar los posibles compuestos bioactivos. Esta identificación puede contribuir a la creación de nuevas vías de investigación para conseguir resultados concluyentes acerca de la acción de dichos compuestos, pero para ello es necesario llevar a cabo este estudio previo.

## **5 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN**

El objetivo general de esta investigación es conocer la ruta metabólica de los compuestos fenólicos del aceite de oliva en el colon mediante un sistema de fermentación colónica *in vitro*.

El objetivo específico es motivar la realización de más investigaciones en relación con este tema para así poder ampliar la información disponible sobre las modificaciones que sufren en el colon los compuestos fenólicos.

## 6 MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1 Diseño del estudio

El estudio persigue analizar los metabolitos generados a partir de la fermentación *in vitro* de compuestos fenólicos del aceite de oliva empleando muestras de heces humanas procedentes de 3 individuos sanos (H1, H2 y H3) como inóculo para poder así simular el proceso que se lleva a cabo en el colon. Las fermentaciones se llevaron a cabo para cada compuesto de forma individual, es decir, las heces de cada uno de los individuos participantes en el estudio se sometieron a la fermentación *in vitro* de un mismo compuesto de forma simultánea.

El proceso de fermentación de cada uno de los compuestos de interés se llevó a cabo durante seis tiempos diferentes: 0, 2, 6, 12, 24 y 48 horas. Se realizaron tres réplicas por tiempo e individuo. Las condiciones de la fermentación fueron las siguientes: se depositaron en una cámara de incubación (orbitales) a 37°C con agitación permanente (60rpm) y en anaerobiosis, de tal forma que las condiciones de la fermentación simulaban el ambiente del colon.

En el estudio participaron como voluntarios tres individuos sanos (un hombre y dos mujeres) cuya dieta no sufrió restricciones a lo largo del periodo experimental.

A la hora de seleccionar los individuos se tuvo en cuenta los siguientes criterios de exclusión:

- Haber consumido antibióticos en los últimos seis meses.
- Haber sufrido problemas gastrointestinales en los últimos seis meses.

Los individuos declararon no haber consumido antibióticos en los últimos seis meses previos al estudio y no haber sufrido de problemas gastrointestinales durante el mismo periodo. Las heces frescas pertenecientes a cada individuo se homogenizaron mediante el uso de una espátula, se alicuotaron (20g cada alícuota) y pasaron a ser congeladas a -80°C hasta el momento del inicio de la fermentación.



## 6.2 Material

Disoluciones y reactivos:

- Para la solución de elementos traza: 3680mg/l  $\text{FeSO}_4$ , 1159mg/l  $\text{MnSO}_4$ , 440mg/l  $\text{ZnSO}_4$ , 120mg/l  $\text{CoCl}_2$ , 98mg/l  $\text{CuSO}$  y 17.4mg/l  $\text{Mo (NH}_4\text{)}$ . Es preparada con agua Milli-Q y puede ser mantenida en nevera a 4°C hasta el momento de su empleo.
- Para la solución tampón carbonato-fosfato, contiene 9.240g/l  $\text{NaHCO}_3$ , 3.542g/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.470g/l  $\text{NaCl}$ , 0.45g/l  $\text{KCl}$ , 0.227g/l  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 0.055 g/l  $\text{CaCl}_2$  (anhidro), 0.1g/l  $\text{MgCl}_2$  y 0.4g/l Urea. Es preparada con agua Milli-Q.
- Compuestos a fermentar: los compuestos estándares TYR, OHT, OHT-ac y OL fueron adquiridos de Extrasynthese (Genay, France).
- Para el tratamiento de las muestras y la preparación para el análisis: HCl 37%, acetato de etilo,  $\text{H}_2\text{O/ACN/MeOH}$ ,  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (85%), metanol.

## 6.3 Procedimiento

Este modelo de fermentación colónica *in vitro* se realizó siguiendo la metodología descrita por *Durand et al.* [23].

### 6.3.1 Preparación del medio de cultivo, suspensión fecal (5%) y blancos.

El medio de cultivo a partir del cual se inocularon las heces y se llevó a cabo la fermentación de los estándares fenólicos se preparó añadiendo 10 ml de la solución de elementos traza por litro de solución carbonato - fosfato. Una vez hecha la mezcla y antes de la fermentación, esta fue reducida en una cámara de anaerobiosis durante dos días a temperatura ambiente y en ausencia de luz.

Para preparar la suspensión fecal al 5%, se pesó la cantidad de materia fecal adecuada y se mezcló con la solución anterior (medio de cultivo). A continuación se homogeneizó en el Stomacher durante 60 segundos y se dejó reposar 30 minutos. Finalmente esta suspensión se distribuyó en tubos desechables de plástico, una cantidad de 10ml por tubo.

Para este experimento se necesitaron tres tipos de blancos cuya preparación se explica a continuación (Figura 7):

- Blanco con suspensión fecal sin compuesto: este blanco se prepara añadiendo 10ml de la suspensión fecal (heces + medio de cultivo) por tubo de fermentación. No se añadió el compuesto a fermentar. De este blanco se preparó un tubo por cada tiempo de fermentación e individuo. Una vez analizado, este dato se restará al obtenido en las muestras de los diferentes tiempos, para así descontar la presencia de compuesto en las heces.
- Blanco medio de cultivo con compuesto: de este blanco se prepararon tres replicas que fueron fermentadas 24 horas. Dicho blanco consiste en 10ml de medio de cultivo (sin adición de heces) y se adicionó la misma cantidad de compuesto a fermentar que en las muestras. De esta manera se puede saber si hay una degradación del compuesto debida a la acción del medio, es decir, si hay una degradación química.
- Blanco con suspensión fecal esterilizada con compuesto: este blanco se prepara inactivando la microbiota mediante autoclavando a 120°C durante 30 minutos 40ml de suspensión fecal contenido en botellas de Pirex. Tras el proceso de esterilización el contenido se alícuota en tubos de 10ml y se adiciona el compuesto a fermentar (misma cantidad que en las muestras) y se fermenta durante 24 horas.

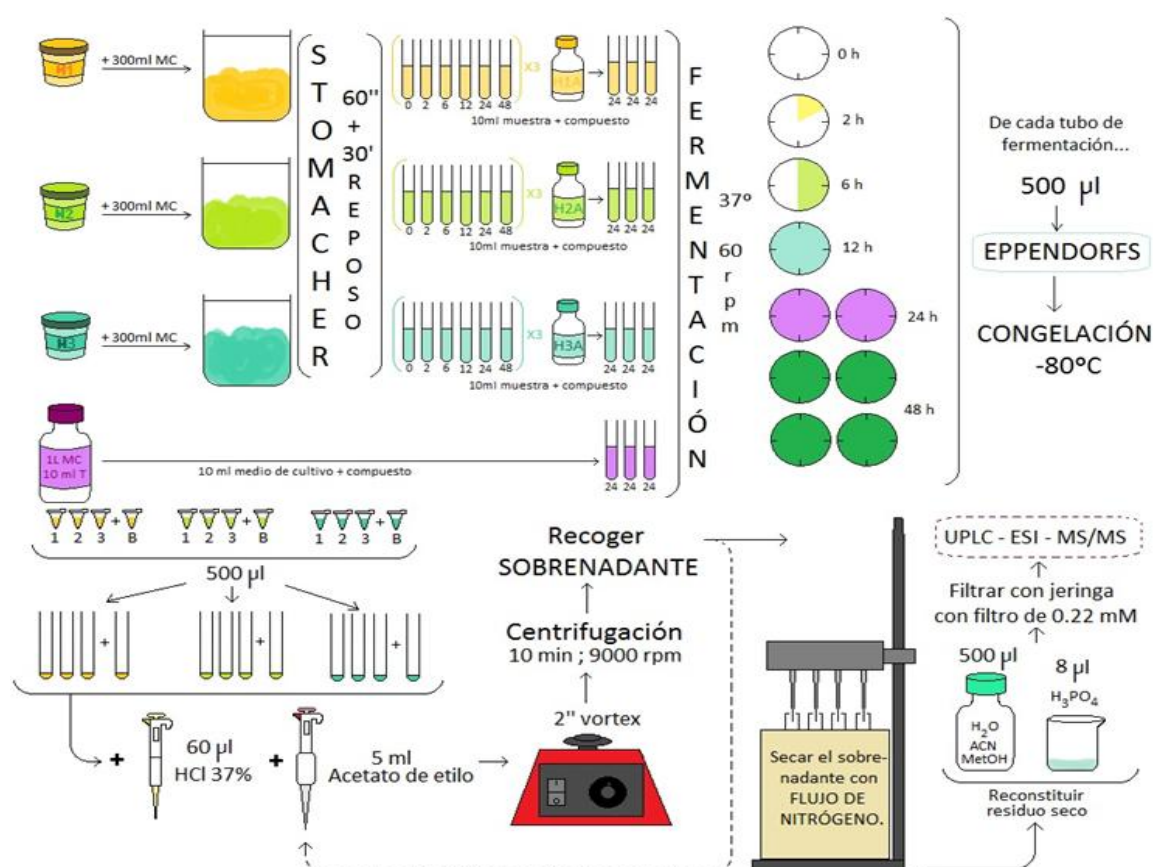
### **6.3.2 Preparación de las muestras para la fermentación.**

Se alícuotaron en los tubos de cada tiempo y en los blancos 10ml de suspensión fecal y se añadió el compuesto a fermentar (5  $\mu$ moles de compuesto/10ml, concentración final 500 $\mu$ M), excepto en los tubos del blanco que no llevaban compuesto y se fermentaron en cada tiempo. Los tubos fueron colocados en las campanas de anaerobiosis, para crear tal condición se emplearon bolsas generadoras de anaerobiosis. Para confirmar la ausencia de oxígeno se emplearon tiras reactivas, las cuales cambian de color cuando el ambiente interno de la campana está en anaerobiosis.

Las campanas conteniendo las muestras se incubaron en agitadores orbitales a 37 °C y con una agitación suave constante (60 rpm). Transcurrido el tiempo de fermentación se retiraron los tubos, se homogenizó su contenido y se recogió una alícuota de 500 $\mu$ l de cada tubo, la cual fue traspasada a tubos Eppendorf para su almacenamiento a -80°C hasta su preparación para su análisis por UPLC-ESI-MS/MS.

### 6.3.3 Preparación de la muestra para el análisis de los metabolitos fenólicos mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas en *tandem* (UPLC-ESI-MS/MS)

Los tubos Eppendorf que contenían los 500µl de suspensión fecal sometida a fermentación fueron descongelados lentamente en hielo y el contenido se traspasó a un tubo de plástico de mayor capacidad (10ml). A continuación se agregaron 60µl de HCl 37% con el fin de inactivar la microbiota colónica y se añadieron 5ml de acetato de etilo. Los tubos se agitaron durante 2 minutos y se centrifugaron a 9000rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente (21°C). Una vez finalizada la centrifugación se recogió sobrenadante que correspondía a la fracción de acetato de etilo y se depositó en un nuevo tubo. Este proceso de extracción con acetato de etilo se repitió de nuevo. Los sobrenadantes obtenidos de ambas centrifugaciones se combinaron (aproximadamente 10ml) y se evaporaron bajo corriente de nitrógeno a 30°C. El residuo seco resultante de la evaporación se reconstituyó con 500µl de agua/acetonitrilo/metanol (86:12:2) y se acidificó con 8µl de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (85%). Finalmente, el extracto se filtró a través de jeringas con filtro 0.22µm y fue transferido a viales para su posterior análisis con UPLC-ESI-MS/MS (Figura 7).



**Figura 7.** Esquema del procedimiento seguido para la preparación de las muestras para la fermentación y análisis.

#### 6.3.4 Análisis cromatográfico

El análisis de los estándares y sus metabolitos se realizó mediante sistema de cromatografía líquida Waters Acquity Ultra-Performance™ (Waters, Milford MA, USA) equipado con un sistema de bombas binario (Waters, Milford, MA, USA). La columna de cromatografía fue una Acquity BEH C18 (100 mm x 2.1 mm i.d.) con un tamaño de partícula de 1,7  $\mu$ m (Waters, Milford MA, USA). Se utilizó una fase móvil binaria con una elución en gradiente. La fase móvil A consistió en una mezcla de agua Milli-Q: ácido acético (99,8:0,2 v/v) mientras que la B fue 100% acetonitrilo. El gradiente de elución fue: 0–2.10 min, 3% B; 2.10–7 min, 3–7% B; 7–25 min, 7–40% B 25–25.10 min, 40–100% B; 25.10–27.10 min, 100–3% B; 27.10–30 min, 3% B isocrática. La velocidad de flujo fue 0,4 ml/min y el volumen de inyección fue 2.5  $\mu$ l.

La espectrometría de masas en tándem (MS/MS) se llevó a cabo con un detector triple cuadrupolo (TQD) espectrómetro de masas (Waters, Milford MA, USA) equipado con una interfase electrospray de tipo Z- spray. El análisis se llevó a cabo en modo negativo para los compuestos fenólicos. Los datos se obtuvieron empleando software MassLynx v 4.1

La cuantificación del catecol, ácido hidroxifenilacético (PAA), ácido para-hidroxifenilbenzoico (*p*-OHBA), ácido 3-hidroxifenilpropiónico (3-PPA), ácido para-hidroxifenilpropiónico (*p*-OHPPA), ácido meta- hidroxifenilacético (*m*-OHPPA), ácido orto-hidroxifenilacético (*o*-OHPPA), ácido para-cumárico (*p*-CMA), ácido orto- cumárico (*o*-CMA), ácido protocatecuico (PCA), OHT, TYR, OHT-ac, OL, GA (ácido gálico), ácido dihidroxifenilacético (di-OHPPA), ácido para- hidroxifenilpropiónico (*p*-OHPPA), ácido dihidroxifenilpropiónico (di-OHPPA), ácido cafeico (CA) y ácido ferúlico (FA) fueron cuantificados mediante la curva de calibrado de sus respectivos estándares. HVA y EA fueron cuantificados utilizando la curva de calibrado del CA mientras que 3,4-EA se cuantificó empleando la recta de calibrado de la OL.

#### 6.3.5 Análisis estadístico

Las muestras de TYR, OHT, OHT-ac y OL fueron analizadas en medios de cultivo inoculados con muestras de heces de tres individuos sanos en tres experimentos por separado. Cada muestra fue analizada por triplicado y los datos están expresados como medias de las tres réplicas. El valor representado en las tablas corresponde al valor de la media menos el contenido del blanco. Los datos fueron analizados utilizando el programa informático EXCEL versión 2007.

## 7 RESULTADOS

Las muestras fueron analizadas mediante UPLC-ESI-MS/MS para poder así detectar la posible degradación microbiana y producción de metabolitos microbianos experimentada por los compuestos fenólicos del aceite de oliva al entrar en contacto con la microbiota del colon, mediante un modelo de fermentación *in vitro*. La monitorización de la fermentación se llevó a cabo para cada compuesto de forma individual y en un intervalo de tiempo entre 0 y 48 horas.

Los resultados que se exponen a continuación se presentan por cada muestra de heces H1, H2 y H3 cuyos valores medios se obtuvieron calculando la media de las tres réplicas realizadas y restándole el contenido de la muestra blanco (medio de cultivo con heces pero sin adición de compuesto). Cada uno de los gráficos lineales recoge los datos del compuesto fermentado y de los posibles metabolitos detectados en mayor proporción (datos completos ver Anexo). Las rutas metabólicas propuestas (Fig. 8, 10, 12 y 14) se construyeron a partir de los metabolitos detectados y considerados como posibles productos de degradación de los compuestos fenólicos a lo largo del proceso de fermentación teniendo en cuenta la posible reacción microbiana involucrada en dicha conversión.

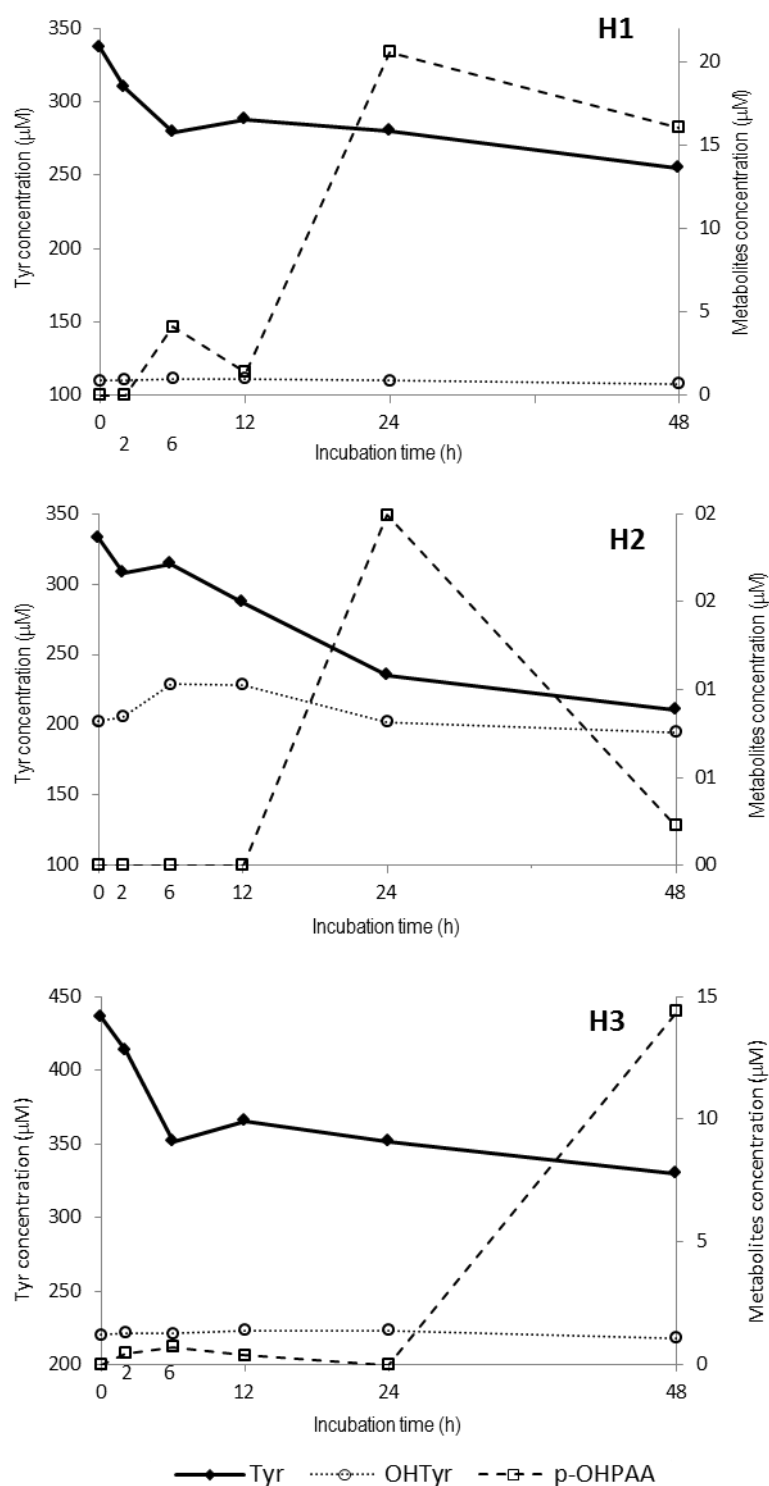
### 7.1 Fermentación colónica *in vitro* de TYR, OHT, OHT-ac y OL.

- TYR

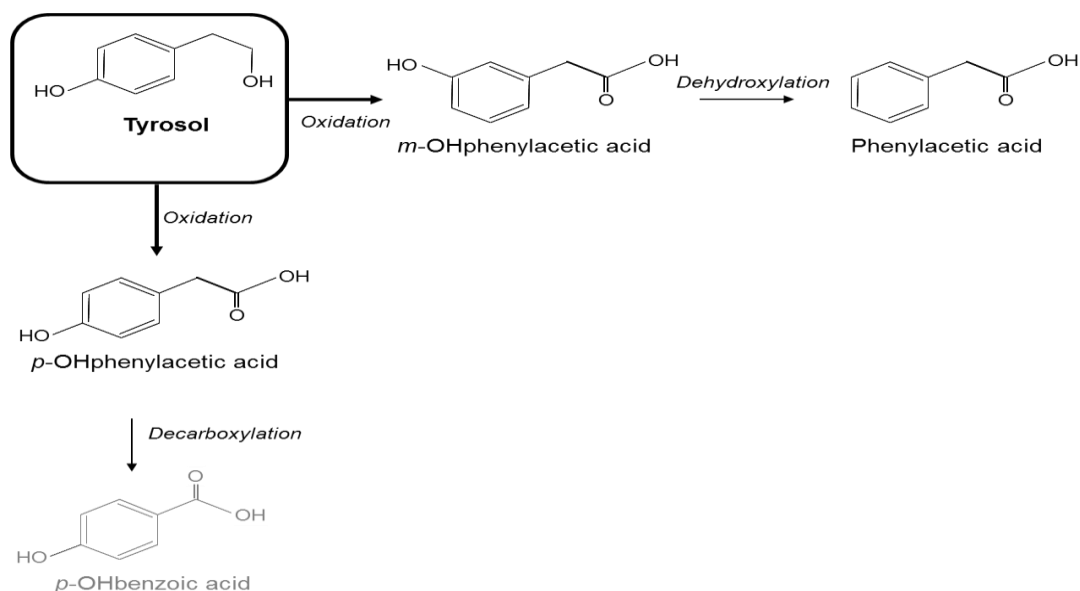
En la Figura 8 se observa que durante las primeras 6h de incubación es cuando se produce la mayor degradación del TYR en H1 y H3, mientras que en H2 la desaparición de TYR del medio se extiende de forma menos abrupta hasta las 24h. A partir de las 12h, en H1 y H2 sigue habiendo una degradación del compuesto pero de manera menos pronunciada. Pese a esta degradación a lo largo de las 48 horas de incubación, la concentración final es alta, lo que muestra una resistencia a la degradación microbiana. A lo largo de la fermentación del TYR se detectó que dos compuestos se encontraban en mayor concentración en las muestras experimentales que en sus respectivos blancos (sin adición de TYR): OHT y *p*-OHPAA. La generación de *p*-OHPAA se produjo mediante oxidación de la molécula de TYR (Figura 9) mientras que no se pudo determinar la reacción responsable de la generación de OHT.

La concentración de OHT fue constante a lo largo de todos los tiempos de fermentación en todas las muestras analizadas. Curiosamente, también se detectaron cantidades similares en el blanco sin heces y con microbiota inactivada (autoclave) poniendo de manifiesto que la presencia de OHT pudo ser producto de una reacción ajena a la microbiota.

Con respecto a la aparición de *p*-OHPAA como consecuencia de la fermentación de TYR se observó un comportamiento diferente entre las tres muestras fermentadas. En H1 se halló una pequeña señal a las 6h de incubación (4,13  $\mu$ M) en coincidencia con la mayor degradación de TYR para luego desaparecer a las 12h y llegar a su máxima concentración a las 24h (20,57  $\mu$ M) disminuyendo discretamente a las 48h. En el caso de H2, no se observó generación de *p*-OHPAA en las primeras 6h de incubación, la mayor concentración de dicho compuesto fue, al igual que en el caso de H1, a las 24h (1,99  $\mu$ M) para luego descender de forma más marcada a las 48h. En H3 la presencia de *p*-OHPAA fue casi inexistente hasta las 48h de fermentación que es cuando alcanza su máxima concentración (14,39  $\mu$ M).



**Figura 8.** Conversión del TYR durante la fermentación colónica *in vitro*. Los datos están expresados como medias en  $\mu\text{mol/L}$  de suspensión fecal que consiste en un 5% de materia fecal humana y el medio de cultivo. Los valores medios fueron calculados restandole al valor promedio de las tres réplicas el valor del control de cada sustancia respectivamente. Las curvas muestran solo aquellos metabolitos que fueron detectados en la suspensión fecal y que han sido considerados como potenciales biomarcadores fecales de la ingesta de aceite de oliva: TYR, OHT y *p*-OHPAA. Las concentraciones de los componentes representados por la línea continua se leen en el eje principal (izquierdo). Las concentraciones de los componentes representados con línea punteada se leen en el eje secundario (derecha).



**Figura 9.** Ruta metabólica propuesta para el TYR a causa de la acción de la microflora colónica humana. Los metabolitos detectados esta en negro, los detectados en menor proporción o no detectados, en gris.

- **OHT**

Durante las 6 primeras horas de incubación es cuando se produce una mayor degradación del OHT tal y como muestra la Figura 10. A partir de las 6h la concentración de OHT en el medio permanece relativamente estable en todas las muestras.

PAA, *p*-OHPAA y 3,4-diOHPAA son los principales compuestos generados a lo largo del tiempo de incubación. El di-OHPAA se forma por oxidación del OHT, a partir de la generación de este ácido fenólico se observan tres rutas diferenciadas, dos parten de reacciones de deshidroxilación y una de descarboxilación. Como resultado de una primera deshidroxilación del di-OHPAA se formaría el *p*-OHPAA, una segunda deshidroxilación daría lugar al PAA (Figura 11).

A lo largo de los tiempos de fermentación, la concentración de 3,4-diOHPAA difiere entre los tres individuos. En H1 la presencia de este compuesto desde el tiempo 0 hasta las 48h es prácticamente nula. En H2, se observa un aumento de la concentración, llegando a un máximo de 2,19  $\mu\text{M}$  a las 24h. Por último, en H3 se observa una mayor concentración a las 48h (3,48  $\mu\text{M}$ ).

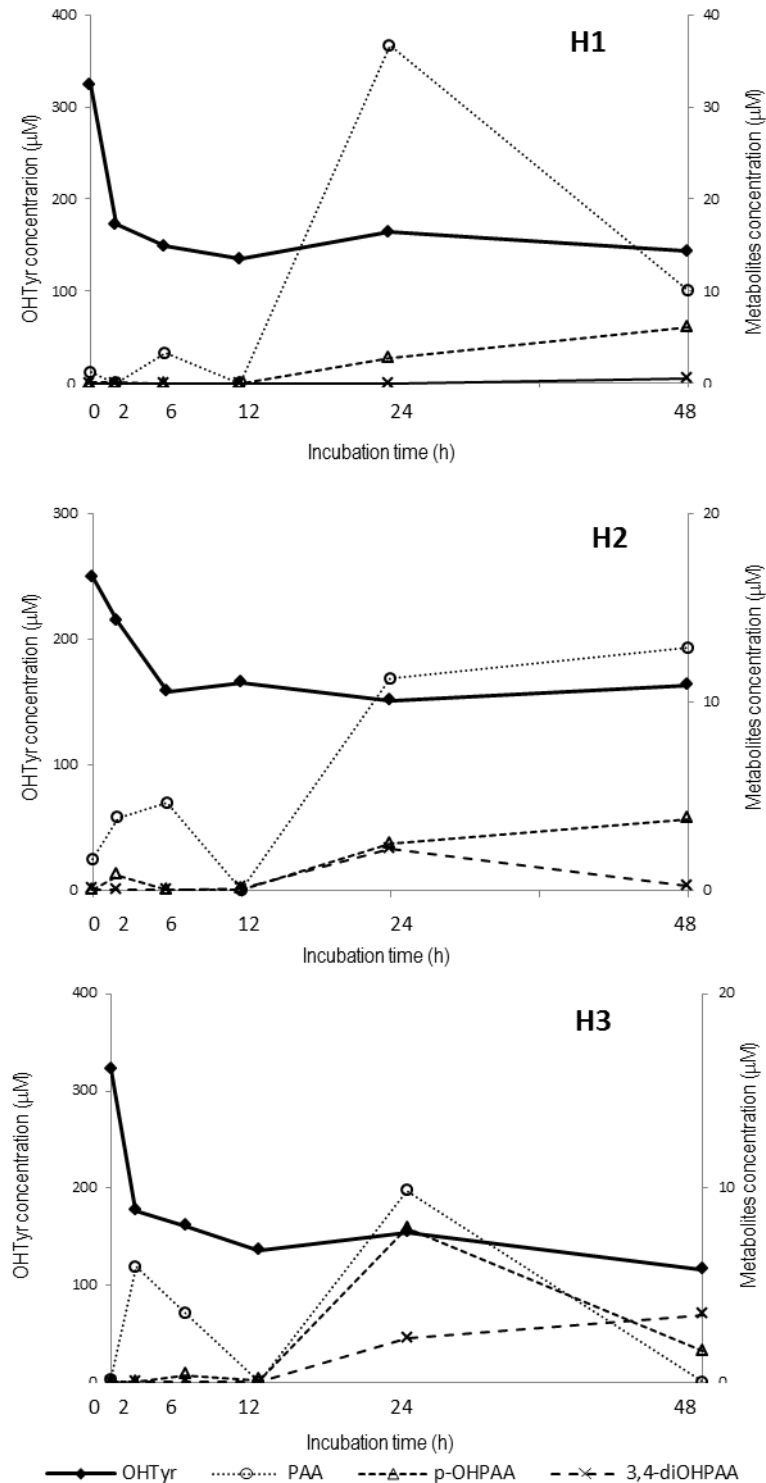
La concentración de *p*-OHPAA va aumentando a medida que transcurren las horas de incubación. Dicho comportamiento es común en H1 y H2, alcanzando una mayor



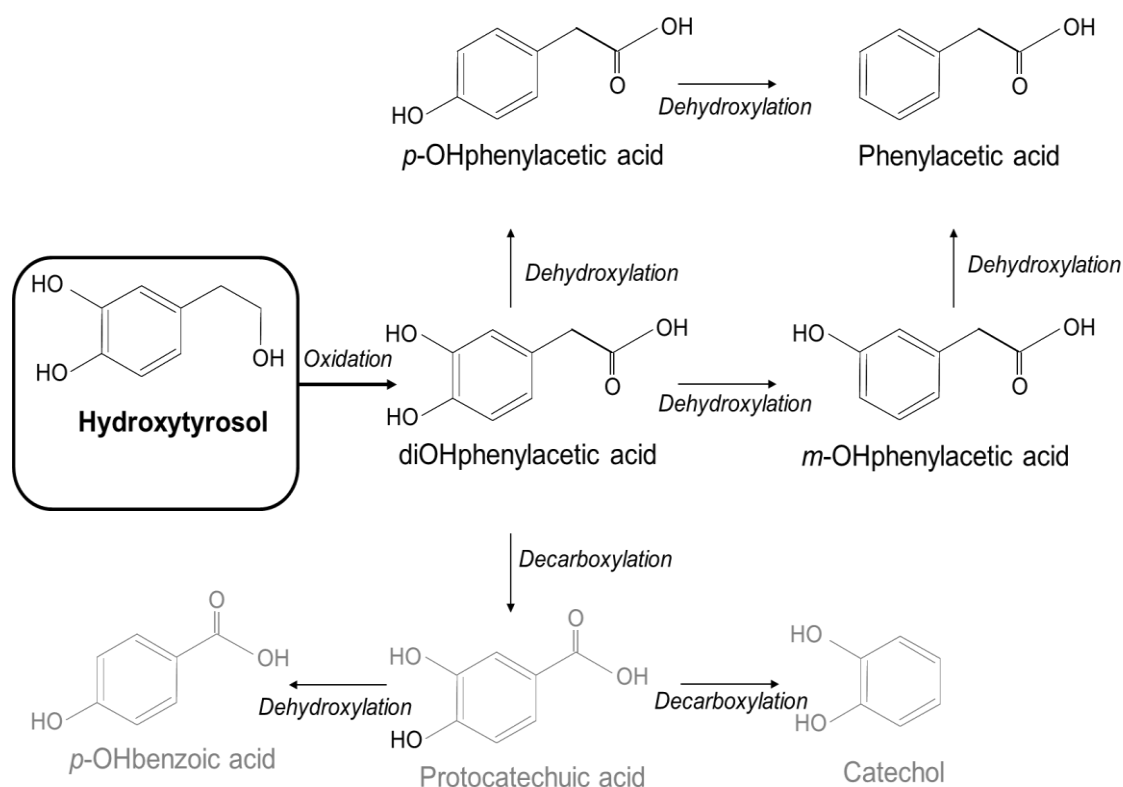
concentración a las 48h (6,16  $\mu\text{M}$  y 3,80  $\mu\text{M}$ ). En el caso de H3 la mayor concentración se alcanza a las 24h (7,94  $\mu\text{M}$ ).

La generación de PAA sigue un patrón similar en los tres individuos. Entre las 12 y las 24h es cuando se observa un mayor aumento en la concentración de este compuesto, alcanzando concentraciones de 36,65  $\mu\text{M}$ , 11,65  $\mu\text{M}$  y 9,87  $\mu\text{M}$  respectivamente a las 24h.

De manera conjunta, la generación de metabolitos del OHT es similar en H1, H2 y H3. En una primera fase que comprende desde 0h hasta las 12h la generación es menor, siendo en una segunda fase, a partir de este punto cuando aumenta la generación. Este hecho coincide con el punto a partir del cual la concentración de OHT se estabiliza. En ninguno de los tres casos hay una degradación total del OHT y la aparición paralela de metabolitos no se corresponde con la cantidad de compuesto degradado.



**Figura 10.** Conversión del OHT durante la fermentación colónica *in vitro*. Los datos están expresados como medias en  $\mu\text{mol/L}$  de suspensión fecal que consiste en un 5% de materia fecal humana y el medio de cultivo. Los valores medios fueron calculados restandole al valor promedio de las tres réplicas el valor del control de cada sustancia respectivamente. Las curvas muestran solo aquellos metabolitos que fueron detectados en la suspensión fecal y que han sido considerados como potenciales biomarcadores fecales de la ingesta de aceite de oliva: OHT, PAA, *p*-OHPAA y 3,4 diOHPAA. Las concentraciones de los componentes representados por la línea continua se leen en el eje principal (izquierdo). Las concentraciones de los componentes representados con línea punteada se leen en el eje secundario (derecha).



**Figura 11.** Ruta metabólica propuesta para el OHT a causa de la acción de la microflora colónica humana. Los metabolitos detectados esta en negro, los detectados en menor proporción o no detectados, en gris.

- **OHT-ac**

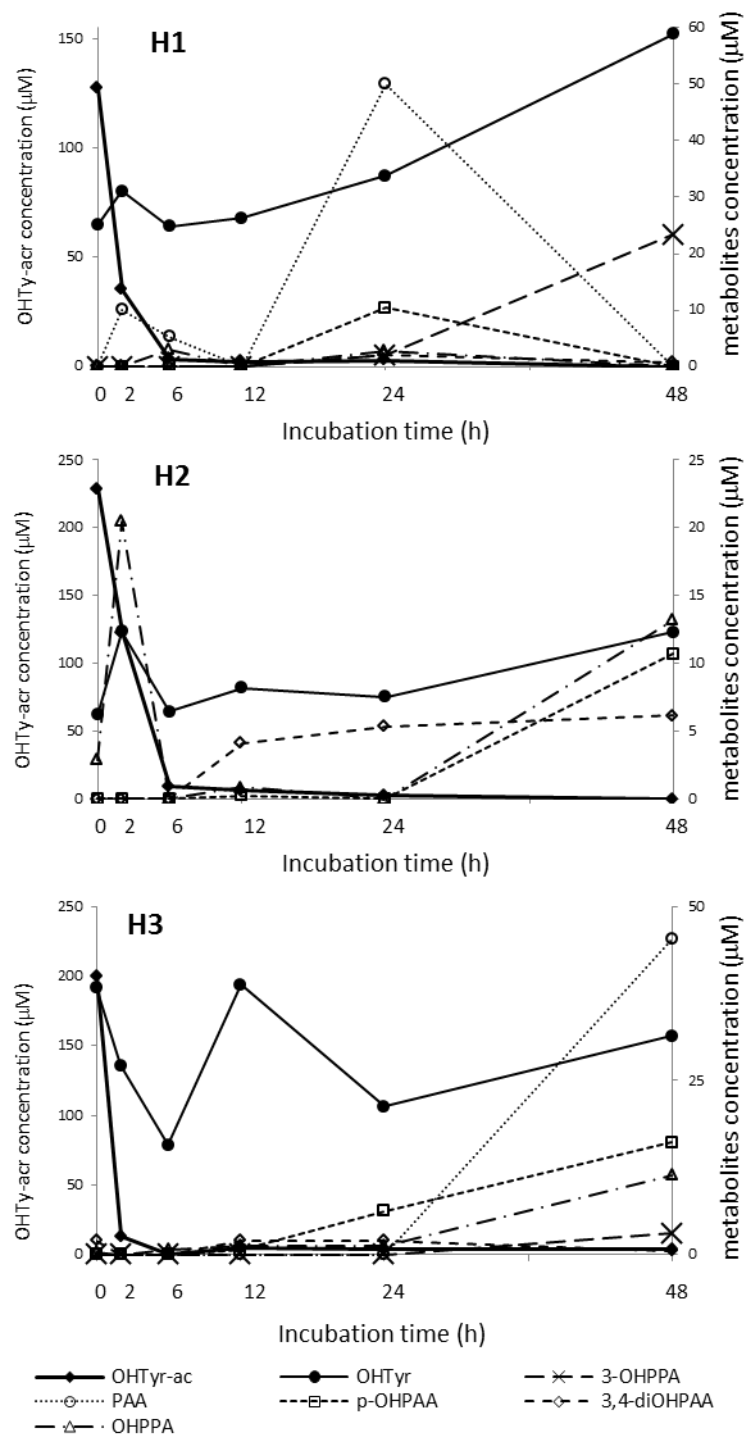
En la Figura 12 se observa el comportamiento del OHT-ac a lo largo del proceso de fermentación. Resulta evidente la degradación prácticamente total de dicha sustancia durante las primeras 6 h de incubación. Se identificaron 6 compuestos como posibles metabolitos microbianos producto de la fermentación *in vitro* del OHT-ac. Estos son OHT, 3-OHPPA, PAA, *p*-OHPPA, 3,4-diOHPPA y OHPPA. Tres son las principales reacciones que se producen para dar lugar a los derivados de este compuesto; una de ellas es la desmetilación, a partir de la cual se forma el di-OHPAA, otra es la hidrólisis, la cual da lugar al OHT mientras que la tercera, que da lugar a la generación de OHPPA no se pudo determinar (Figura 13).

El principal metabolito generado como producto de la fermentación del OHT-ac fue el OHT, a pesar de las oscilaciones observadas a lo largo del tiempo de incubación, hay una clara tendencia al aumento de la concentración en función del tiempo, sobre todo en las muestras H1 y H2.

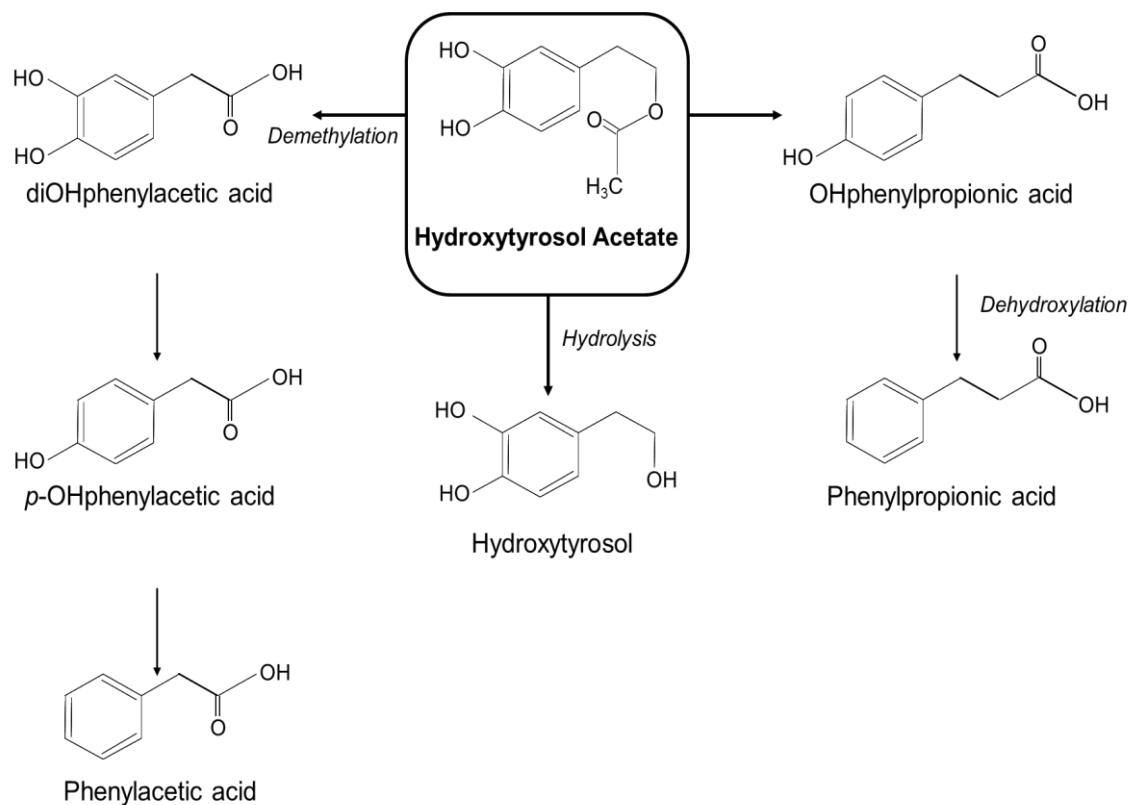
El PAA sólo se detecta en H1 y H3 y ambas muestras presentan la mayor concentración en los tiempos finales de fermentación, 50,07  $\mu\text{M}$  a las 24 h en H1 y 45,28  $\mu\text{M}$  a las 48h en H3.

El *p*-OHPAA no se detectó durante las primeras 24h alcanzando su concentración máxima a las 48h en H2 y H3 (10,67  $\mu\text{M}$  y 16,12  $\mu\text{M}$ ).

Durante el tiempo comprendido entre las 0h y las 2h no hay presencia de OHPPA ni de 3-OHPPA, a partir de las 24h hay un aumento en H1 y H3. En el caso de H2 en las primeras 2h hay un aumento de la concentración pero disminuye hasta llegar a no ser detectado, aunque a las 48h vuelve a aumentar.



**Figura 12.** Conversión del OHT-ac durante la fermentación colónica *in vitro*. Los datos están expresados como medias en  $\mu\text{mol/L}$  de suspensión fecal que consiste en un 5% de materia fecal humana y el medio de cultivo. Los valores medios fueron calculados restandole al valor promedio de las tres réplicas el valor del control de cada sustancia respectivamente. Las curvas muestran solo aquellos metabolitos que fueron detectados en la suspensión fecal y que han sido considerados como potenciales biomarcadores fecales de la ingesta de aceite de oliva: OHT- ac, OHT, 3,4di-OHPAA, p-OHPAA, PAA, 3-OHPAA, OHPPA. Las concentraciones de los componentes representados por la línea continua se leen en el eje principal (izquierdo). Las concentraciones de los componentes representados con línea punteada se leen en el eje secundario (derecha).



**Figura 13.** Ruta metabólica propuesta para el OHT-ac a causa de la acción de la microflora colónica humana. Los metabolitos detectados esta en negro, los detectados en menor proporción o no detectados, en gris.

- **OL**

Tal y como se observa en la Figura 14, durante las primeras 12h de incubación es cuando hay una mayor disminución de la concentración de OL. A partir de ese punto, su presencia desaparece casi por completo. Los metabolitos generados a causa de la acción de la microbita colónica fueron cuatro, OHT, OHT-ac, EA y 3,4-EDA. La formación de OHT e OHT-ac es a través de una reacción de hidrólisis de la oleuropeína (Figura 15).

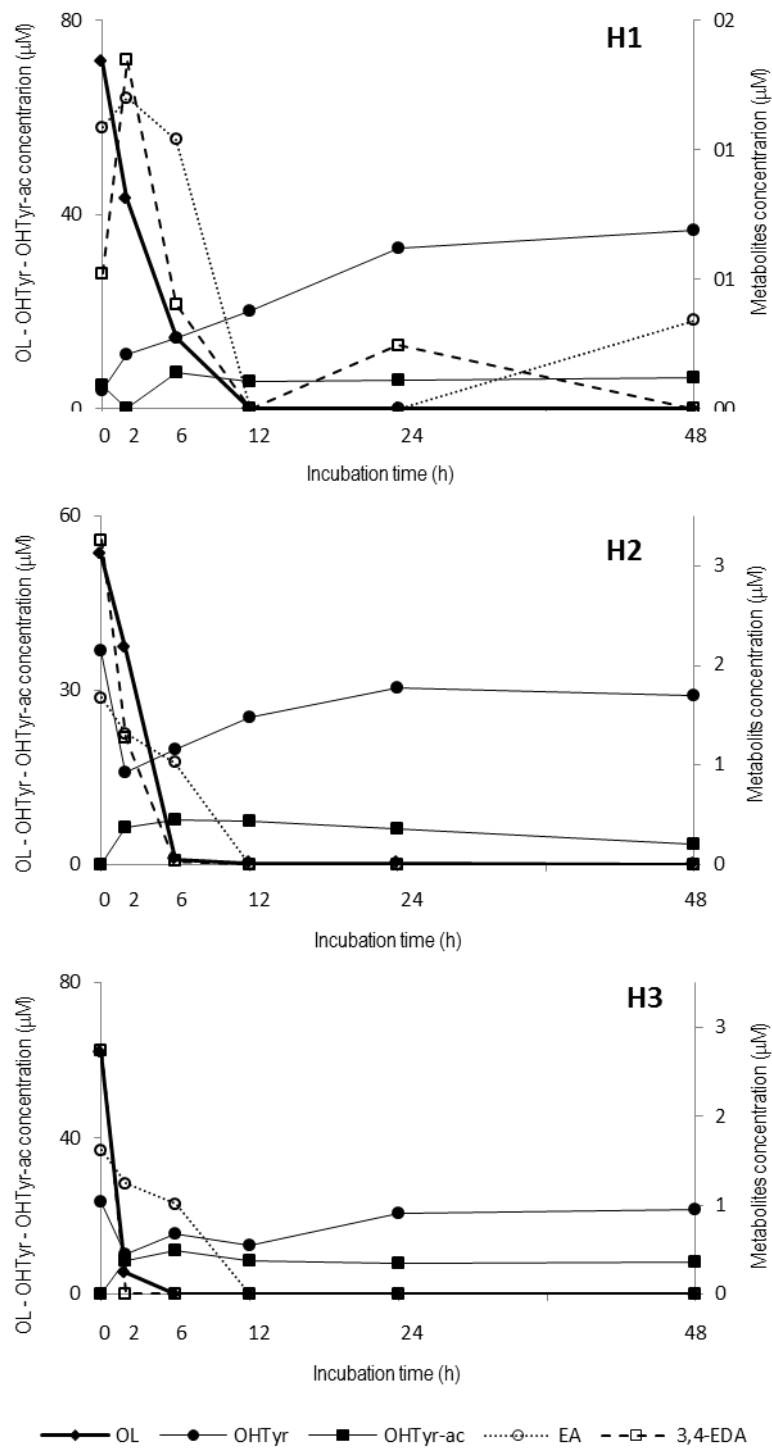
Mientras que en H1 la máxima concentración detectada de OHT es a las 48h (36,71  $\mu\text{M}$ ), en H2 y H3 es en el tiempo 0 (36,84  $\mu\text{M}$  y 23,65  $\mu\text{M}$ ). Sin embargo, a las 48h continúa habiendo una concentración similar a la inicial (29,08  $\mu\text{M}$  y 21,81  $\mu\text{M}$ ).

El OHT- ac tanto en H1, H2 y H3 muestra una estabilidad a partir de las 6 h de fermentación.

La presencia de EA sólo se detecta durante las primeras 12 horas de incubación, a partir de entonces, no se detectó en ninguna de las muestras.

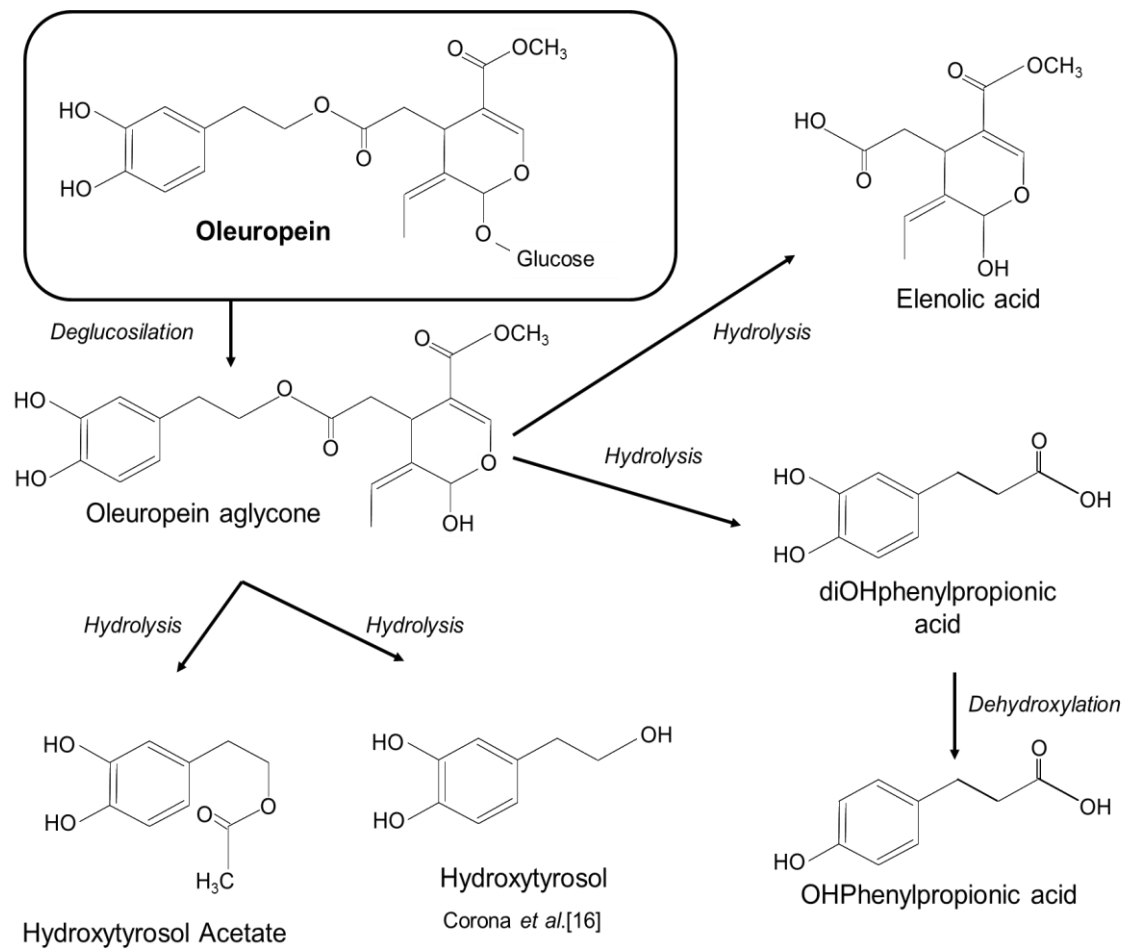
La tendencia de 3,4 EDA a lo largo de las 48h de fermentación es diferente en H1, H2 y H3. De manera conjunta se observa que a partir de las 6h, no hay presencia de este compuesto.

El compuesto que se forma en mayor proporción es el OHT, al igual que ocurre en el caso del OHT-ac.



**Figura 14.** Conversión del OL durante la fermentación colónica *in vitro*. Los datos están expresados como medias en  $\mu\text{mol/L}$  de suspensión fecal que consiste en un 5% de materia fecal humana y el medio de cultivo. Los valores medios fueron calculados restandole al valor promedio de las tres réplicas el valor del control de cada sustancia respectivamente. Las curvas muestran solo aquellos metabolitos que fueron detectados en la suspensión fecal y que han sido considerados como potenciales biomarcadores fecales de la ingesta de aceite de oliva: OL, OHT, OHT-ac, EA y 3,4 EDA. Las concentraciones de los componentes representados por la línea continua se leen en el eje principal (izquierdo). Las concentraciones de los componentes representados con línea punteada se leen en el eje secundario (derecha).





**Figura 15.** Ruta metabólica propuesta para la OL a causa de la acción de la microflora colónica humana. Los metabolitos detectados esta en negro, los detectados en menor proporción o no detectados, en gris.

## 8 DISCUSIÓN

A pesar de que se han realizado numerosos estudios sobre el metabolismo colónico de los compuestos fenólicos para conocer más profundamente los fenómenos que pueden desencadenar a nivel del intestino grueso, pocos han tenido en consideración los pertenecientes al aceite de oliva. Fuentes dietéticas ricas en compuestos fenólicos como el té (ácido gálico, catequina) [24], los frutos rojos (pelargonidina, cianidina), el chocolate negro (epicatequina, catequina) o el café (ácido ferúlico, ácido coumaroilquínico) han sido objeto de la identificación de metabolitos derivados de la fermentación colónica *in vitro* [25].

En este estudio, se utilizó una concentración inicial de 500  $\mu\text{M}$  de cada uno de los compuestos para la fermentación. Como se puede observar en las figuras 8, 10, 12 y 14, la concentración de los estándares en el tiempo 0 es inferior a la cantidad teórica inicial siendo la recuperación media del TYR, OHT, OHT-ac y OL de un 73,68%, 59,64%, 39,45% y 12,47% respectivamente. Una menor recuperación de los estándares puede deberse a la suma de diferentes causas como: la unión a sustancias presentes en la matriz fecal y/o adsorción de las células bacterianas y/o a la eficacia de extracción del acetato de etilo utilizado para extraer los compuestos fenólicos. La eficacia de extracción del acetato de etilo de los compuestos fenólicos en orina varía entre un 47 % y un 75 % para los fenoles simples y es de aproximadamente 35 % [19] para la OL. Mientras que la recuperación del TYR e OHT concuerda con los valores antes mencionados, no ocurre lo mismo en el caso del OHT-ac e OL cuyo porcentaje de recuperación estuvo por debajo de los valores esperados lo cual pone de manifiesto la existencia de otras causas independientes del solvente utilizado. La realización de estudios con muestras biológicas como las de orina y heces trae consigo dificultades a la hora de analizarlas ya que existe la posibilidad de que los compuestos se unan a otras moléculas presentes y aumente así la retención.

La generación de los metabolitos a causa de la acción de la microflora colónica revela diferencias importantes entre los individuos. Dicha diferencia se podría atribuir principalmente a la diversidad en la composición de la microflora colónica entre los individuos participantes del estudio. Esto último ha sido observado en estudios sobre el metabolismo colónico de distintos compuestos fenólicos en los cuales se contó con diferentes donantes de heces y pudieron observarse diferencias en el comportamiento de los perfiles de fermentación entre ellos [4, 26, 27].

Aunque durante las primeras 6 h de fermentación hubo una degradación de los fenoles simples TYR e OHT, se observa una estabilidad de la concentración partir de ese punto, lo cual podría ser debido a un efecto antimicrobiano de tipo selectivo o bacteriostático [28,29]. Aun así, según los resultados, la estabilidad del TYR es mayor que la del OHT, lo cual podría deberse a que el OHT es más sensible a la degradación debido a su estructura química, posee más grupos OH (uno de ellos en posición 3) lo cual aumenta su susceptibilidad microbiana [26].

No hay evidencia científica previa en la que se haya llevado a cabo una fermentación colónica *in vitro* del TYR OHT y OHT-ac pero sí que la hay para la OL. *Corona et al.* [4] llevaron a cabo un estudio *in vitro* en humanos en el cual fermentaron OL, y cuyos resultados coinciden en parte con los nuestros. OL sufrió una rápida degradación y dio lugar a la generación de 3 metabolitos, uno de los cuales fue el OHT, los dos restantes no pudieron ser identificados. En nuestro caso, además del OHT se detectaron 3 metabolitos más: OHT-ac, EA y 3,4 EDA. En el año 2013, *Lin et al.* [30] también estudiaron la biotransformación *in vivo* de la OL pero en este caso, con muestras de heces de rata. Detectaron un total de 3 posibles metabolitos, 3,4-EA, HVA y EA, lo cual concuerda parcialmente con nuestros resultados puesto que en nuestras muestras el HVA no fue detectado. Por otro lado, también propusieron una ruta metabólica para la OL en la que englobaron reacciones de deglucosilación e hidrólisis de la misma manera que en nuestra ruta propuesta (fig. 15). La formación de diferentes metabolitos según se trate de muestras humanas o animales podría deberse a las diferencias entre la microbiota de las ratas, en este caso, y los humanos. Esta diferencia también podría explicar la diferente aparición de los metabolitos a lo largo de las horas de fermentación, teniendo en cuenta que se trata de modelos *in vitro*.

De manera general, TYR e OHT (Fig. 8 y 10) presentan una degradación parcial, pronunciada durante las primeras horas de incubación en H1 H2 y H3, sin embargo, el OHT-ac y la OL (Fig. 12 y 14) a partir de las 12 h de fermentación desaparecen casi por completo producto de la actividad de la microbiota colónica. Como resultado de esta hidrólisis aumenta la concentración de otros compuestos como el OHT y el OHPPA en el caso de OHT-ac, y aumenta la concentración de OHT, OHT-ac, EA y 3,4 EDA en el caso de la OL. Conjuntamente, el OHT es el metabolito que se forma en mayor cantidad a lo largo de las horas de incubación, por lo tanto, el metabolismo de las bacterias colónicas podría tener un efecto sobre la biodisponibilidad del OHT a nivel del colon. Pese a que una vez ingerido a través de las diversas fuentes dietéticas, sobre todo aceite de oliva, el OHT es absorbido en su mayoría en el intestino delgado [16] la cantidad restante junto con el OHT procedente de otras fuentes, como la OL y el OHT-ac y la estabilidad a lo largo de las horas en el colon podría dar lugar a

efectos beneficiosos. Al tratarse de un compuesto hidrosoluble [10], el OHT forma parte de la fracción acuosa de la materia fecal. Esta localización favorece el contacto con la mucosa intestinal y también con los compuestos tóxicos que ponen en peligro la integridad de la mucosa, pudiendo ejercer su efecto a nivel local como antioxidante [31, 32]. Por otro lado, en los últimos años se ha visto aumentado el número de estudios *in vitro* en los cuales se demuestra que el OHT tiene un efecto quimiopreventivo contra diversos tipos de cáncer, como el de colon, gracias a su efecto biológico en rutas de señalización (supervivencia celular, progresión celular y apoptosis) [33, 34, 35, 36]. Además, el OHT podría ser absorbido a nivel del colon de la misma manera que se ha demostrado que lo hacen otros ácidos fenólicos [37,38] pudiendo ejercer su efecto en otros órganos o tejidos. Por otro lado, la aparición de ácidos fenólicos simples como el *p*-OHPAA como resultado de la degradación del TYR, OHT y OHT-ac o el PAA como resultado de la degradación del OHT y OHT-ac también jugarían un papel a nivel local puesto que mediante modelos de experimentación *in vitro* con células de cáncer de colon se ha observado su papel anticancerígeno [39,40].

Por tanto, en el caso de que los compuestos fenólicos del AOV lleguen intactos al colon, los productos de fermentación generados como el OHT libre y ácidos fenólicos podrían dar lugar a un posible beneficio a nivel local. Para ello es necesario la realización de futuros estudios *in vivo* del metabolismo colónico y su posible uso terapéutico en enfermedades intestinales.

## 9 CONCLUSIONES

- Los fenoles simples pertenecientes al aceite de oliva como son el TYR e OHT son degradados en menor medida por la microbiota colónica debido a la estabilidad de la concentración después de 12h de fermentación.
- Otros compuestos fenólicos del aceite de oliva como el OHT-ac y OL, generan OHT como principal metabolito bacteriano, resultado de su contacto con la suspensión fecal.
- La presencia de OHT libre en heces podría jugar un importante papel en la prevención local de enfermedades del colon. Los resultados obtenidos son el primer paso para la realización de mayor investigación en esta área.

## 10 BIBLIOGRAFÍA

1. Fundación Dieta Mediterránea (2013). Dieta Mediterránea y UNESCO [en línea]. [Consultado: 8 de mayo de 2013]. Disponible en internet: <http://dietamediterranea.com/mediterraneo/dieta-mediterranea-y-la-unesco/>
2. Willett WC, Sacks F, Trichopoulou A, Drescher G, et al. Mediterranean diet pyramid: A cultural model for healthy eating. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1995; 61(6): 140.
3. Buckland G, González CA, Agudo A, Vilardell M, Berenguer A, Amiano P, *et al.* Adherence to the Mediterranean Diet and Risk of Coronary Heart Disease in the Spanish EPIC Cohort Study. *Am. J. Epidemiol.*, 2009; 170 (12): 1518–1529.
4. Fidanza F, Alberti A, Lanti M, Menotti A. Mediterranean Adequacy Index: correlation with 25-year mortality from coronary heart disease in the Seven Countries Study. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.*, 2004; 14(5):254.
5. Trichopoulou A, Bamia C, Lagiou P, Buckland G, Grioni S, Agnoli C, et al. Mediterranean diet and colorectal cancer risk: results from a European cohort. *Eur. J. Epidemiol.*, 2013; 28:317–328.
6. Sofi F, Abbate R, Gesini GF, Casini A. Accruing evidence on benefits of adherence to the Mediterranean diet on health: an updated systematic review and meta-analysis. *Am. J. Clin. Nutr.* 2010; 92:1189–96.
7. Rafehi H, Ververis K, Karagiannis TC. Mechanisms of Action of Phenolic Compounds in Olive. *J. Dietary. Suppl.*, 2012; 9(2):96–109.
8. Frankel EN. Nutritional and Biological Properties of Extra Virgin Olive Oil. *J. Agric. Food Chem.*, 2011; 59:785–792.
9. Cicerale S, Lucas LJ, Keast RSJ. Biological Activities of Phenolic Compounds Present in Virgin Olive Oil. *Int. J. Mol. Sci.*, 2010; 11: 458-479.

10. Crozier A, Jaganath IB, Clifford MN. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat. Prod. Rep.*, 2009; 26: 1001–1043.
11. Ciceralo S, Lucas LJ, Keast RSJ. Antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory phenolic activities in extra virgin olive oil. *Current Opinion in Biotechnology*, 2012; 23:129–135.
12. Gómez Romero M, García Villalba R, Carrasco Pancorbo A, Fernández Gutiérrez A (2012). Metabolism and Bioavailability of Olive Oil Polyphenols, Olive Oil - constituents, Quality, Health Properties and Bioconversions, Dr. Dimitrios Boskou (Ed.), ISBN: 978-953-307-921-9, InTech, disponible en internet: <http://www.intechopen.com/books/olive-oil-constituents-quality-health-properties-and-bioconversions/metabolism-and-bioavailability-of-olive-oil-polyphenols>.
13. Pereira Caro G, Sarriá B, Madrona A, Espartero J.L, Escuderos M. E, Bravo L *et al.* Digestive stability of hidroxytyrosol, hidroxytyrosol acetate and alkyl hidroxytyrosyl ethers. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 2012; 63(6): 703- 707.
14. Soler-Rivas C, Espín JC, Wichers H. Oleuropein and related compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2010; 80: 1013–1023.
15. Pinto J, Spencer JPE, Paiva Martins F, Corona G, Debnam ES, Oruna Concha MJ *et al.* Absorption and metabolism of olive oil secoiridoids in the small intestine. *Br. J. Nutr.*, 2011; 105: 1607–1618.
16. Corona G, Spencer JPE, Tzonounis X, Dessi MA, Deiana M, Debnam ES *et al.* The fate of olive oil polyphenols in the gastrointestinal tract: Implications of gastric and colonic microflora-dependent biotransformation. *Free Radic. Res.*, 2006; 40(6): 647–658.
17. Markipoulos C, Vertzoni M, Agalias A, Magiatis P, Reppas C. Stability of oleuropein in the human proximal gut. *JPP*, 2009; 61: 143–149.
18. Corona G, Spencer JPE, Dessi MA. Extra virgin olive oil phenolics: absorption, metabolism, and biological activities in the GI tract. *Toxicology and Industrial Health*, 2009; 25: 285–293.

19. García Villalba R, Carrasco Pancorbo A, Nevedomskaya E, Mayboroda OA, Deelder AM et al. Exploratory analysis of human urine by LC–ESI-TOF MS after high intake of olive oil: understanding the metabolism of polyphenols. *Anal Bioanal. Chem.*, 2010; 398: 463- 475.
20. Tremaroli V, Bäckhed F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature*, 2012; 11552 (489): 242-247.
21. Bolca S, Van Del Wiele T, Possemiers S. Gut metabotypes govern health effects of dietary polyphenols. *Current Opinion in Biotechnology*, 2013; 24:220–225.
22. Egert M, de Graaf AA, Smidt H, de Vos WM, Vanema K. Beyond diversity: functional microbiomics of the human colon. *Trends in Microbiology*, 2006; 14 (2): 86-91.
23. Durand M, Dumay C, Beaumatin P, Morel M.T. Use of the Rumen Simulation Technique (RUSITEC) to Compare Microbial Digestion of Various By- products. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 1988; 21: 197-204.
24. Gross G, Jacobs D.M, Peters S, Possemiers S, Van Duynhoven J, Vaughan E.E et al. In Vitro Bioconversion of Polyphenols from Black Tea and Red Wine/Grape Juice by Human Intestinal Microbiota Displays Strong Interindividual Variability. *J. Agric. Food Chem.*, 2010; 58: 10236-10246.
25. Dall'Asta M, Calani L, Tedeschi M, Jechiu L, Brighenti F, Del Rio D. Identification of microbial metabolites derived from in vitro fecal fermentation of different polyphenolic food sources. *Nutrition*, 2012; 28: 197-203.
26. Hidalgo M, Oruna Concha MJ, Kolida S, Walton GE, Kallithraka S, Spencer JPE *et al.* Metabolism of Anthocyanins by Human Gut Microflora and Their Influence on Gut Bacterial Growth. *J. Agric. Food Chem.*, 2012; 60: 3882- 2890.
27. Rechner AR, Smith MA, Kuhnle G, Gibson GL, Debnam ES, Srail SKS et al. Colonic metabolism of dietary polyphenols: influence of structure on microbial fermentation products. *Free Radic. Biol. Med.*, 2004; 36 (2): 212- 225.



28. Besignano G, Tomaino A, Lo Cascio R, Crisafi G, Uccella N, Saija A. On the *in vitro* antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *J. Pharm. Pharmacol.*, 1999; 51: 971- 974.
  
29. Medina E, De Castro A, Romero C, Brenes M. Comparison of the Concentrations of Phenolic Compounds in Olive Oils and Other Plant Oils: Correlation with Antimicrobial Activity. *J. Agric. Food Chem.*, 2006; 54: 4954 – 4961.
  
30. Lin P, Qian W, Wang X, Cao L, Li S, Qian T. The biotransformation of oleuropein in rats. *Biomed. Chromatogr.*, 2013; ( Version electronica).
  
31. Fernández M, Mateos R, García Parrilla MC, Puertas B, Cantos Villar E. Bioactive compounds in wine: Resveratrol, hydroxytyrosol and melatonin: A review. *Food Chem.*, 2012; 130: 797- 813.
  
32. Tuck KL, Hayball PJ. Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects. *J. Nutr. Biochem.*, 2002; 13: 636- 644.
  
33. Casaburi I, Puoci F, Chimento A, Siarinni R, Ruggiero C, Avena P et al. Potential of olive oil phenols as chemopreventive and therapeutic agents against cancer: A review of *in vitro* studies. *Mol. Nutr. Food Res.*, 2013; 57: 71-83.
  
34. Corona G, Deiana M, Incani A, Vauzour D, Dessì MM, Spencer JPE. Inhibition of p38/CREB phosphorylation and COX-2 expression by olive oil polyphenols underlies their anti-proliferative effects. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2007; 362: 606-611.
  
35. Guichard C, Pedruzzi E, Fay M, Marie JC, Braut Boucher F, Daniel F *et al.* Dihydroxyphenylethanol induces apoptosis by activating serine/threonine protein phosphatase PP2A and promotes the endoplasmic reticulum stress response in human colon carcinoma cells. *Carcinogenesis*, 2006; 27 (9): 1812- 1827.
  
36. Hashim YZHY, Rowland IR, McGlynn H, Servili M, Selvaggini R, Taticchi A *et al.* Inhibitory effects of olive oil phenolics on invasion in human colon adenocarcinoma cells *in vitro*. *Int.J. Cancer*, 2008; 122: 495-500.

37. Rios LY, Gonthier MP, Rémésy C, Mila I, Lapierre C, Lazarus SA et al. Chocolate intake increases urinary excretion of polyphenol-derived phenolic acids in healthy human subjects. *Am J Clin Nutr.*, 2003; 77: 912-920.
38. Rechner AR, Kuhnle G, Hu H, Roedig Penman A, Van der Braak MH, Moore KP et al. The Metabolism of Dietary Polyphenols and the Relevance to Circulating Levels of Conjugated Metabolites. *Free Radic. Res.*, 2002; 36 (11): 1229-1241.
39. Henning SM, Wang P, Abgaryan N, Vicinanza R, Moura de Oliveira D, Zhang Y et al. Phenolic acid concentrations in plasma and urine from men consuming Green or black tea and potential chemopreventive properties for colon cancer. *Mol. Nutr. Food Res.*, 2013; 57: 483- 492.
40. Brown E.M, McDougall G.J, Stewart D, Pereira Caro G, Gonzalez Barrio R, Allsopp P *et al.* Persistence of Anticancer Activity in Berry Extracts after Simulated Gastrointestinal Digestion and Colonic Fermentation. *Plos ONE*, 2012; 7 (11): e9740.

## 11 ANEXOS

Fermentación *in vitro* de OHT y generación de metabolitos.

Comp ( $\mu$ M)	Muestra fecal	Tiempo de incubación (h)					
		0	2	6	12	24	48
<b>OHT</b>	H1	324.15	173.49	149.36	134.94	164.48	143.78
	H2	248.78	214.12	158.39	165.79	151.04	163.13
	H3	321.73	176.74	161.37	135.25	154.17	115.82
di-OH PAA	H1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.60
	H2	0.05	n.d.	n.d.	0.13	2.19	0.21
	H3	n.n	n.d.	n.d.	n.d.	2.25	3.48
<i>p</i> -OH PAA	H1	0.07	0.10	n.d.	n.d.	2.81	6.16
	H2	n.d.	0.80	n.d.	0.06	2.48	3.80
	H3	0.02	n.d.	0.38	0.10	7.94	1.61
<i>m</i> -OH PAA	H1	0.23	2.11	n.d.	n.d.	1.28	0.07
	H2	n.d.	1.20	0.16	n.d.	n.d.	1.19
	H3	0.32	n.d.	n.d.	0.47	0.91	n.d.
PAA	H1	1.17	n.d.	3.29	n.d.	36.65	10.07
	H2	1.64	3.88	4.64	n.d.	11.24	12.89
	H3	0.10	5.95	3.59	n.d.	9.87	n.d.
<i>p</i> -OH BA	H1	0.19	n.d.	n.d.	n.d.	0.84	0.13
	H2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	H3	n.d.	2.39	n.d.	n.d.	n.d.	0.07
PCA	H1	0.07	n.d.	n.d.	n.d.	0.55	0.11
	H2	n.d.	0.20	n.d.	n.d.	0.05	n.d.
	H3	0.01	n.d.	n.d.	0.07	0.23	n.d.
CCH	H1	0.01	n.d.	n.d.	n.d.	0.24	n.d.
	H2	n.d.	0.02	n.d.	n.d.	n.d.	0.08
	H3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.03	n.d.
3-OH PPA	H1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1.05	6.13
OH PPA	H2	n.d.	53.26	n.d.	n.d.	n.d.	129.5
OH PPA	H3	n.d.	0.59	2.44	3.25	5.00	n.d.
PPA	H1	n.d.	1.30	n.d.	n.d.	4.07	0.16
	H2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	10.38	12.69
	H3	n.d.	n.d.	2.01	5.74	5.46	n.d.

Fermentación *in vitro* de OHT-ac y generación de metabolitos.

Comp ( $\mu$ M)	Muestra fecal	Tiempo de incubación (h)					
		0	2	6	12	24	48
<b>OHT-ac</b>	H1	126.90	35.19	3.33	2.36	2.56	n.d
	H2	228.38	122.25	9.4	6.28	2.53	n.d
	H3	236.53	13.42	0.00	5.15	3.76	4.13
OHT	H1	64.83	80.21	64.07	68.08	87.20	152.04
	H2	61.76	123.13	64.09	81.80	75.05	122.87
	H3	203.74	135.49	78.63	193.87	106.32	156.98
di-OH PAA	H1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d	1.98	0.60
	H2	n.d.	n.d	n.d	4.11	5.31	6.13
	H3	1.99	n.d	n.d	1.98	2.01	0.58
<i>p</i> -OH PAA	H1	n.d	n.d.	0.08	n.d.	10.39	n.d
	H2	n.d.	n.d	n.d.	0.2	n.d	10.67
	H3	n.d	n.d	n.d	0.66	6.28	16.12
PAA	H1	n.d	10.11	5.26	n.d	50.07	n.d
	H2	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
	H3	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	45.28
3-OHPPA	H1	n.d	n.d	n.d	n.d	1.99	21.09
OHPPA	H2	2.85	20.46	n.d.	0.85	n.d.	13.17
3-OHPPA	H3	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	15.10
PPA	H1	n.d	0.73	6.27	n.d	60.34	6.27
	H2	0.00	3.23	0.00	0.00	0.00	4.51
	H3	0.00	0.00	2.95	0.11	0.00	30.04
CCH	H1	n.d.	n.d	n.d	n.d	0.10	n.d
	H2	n.d	0.05	n.d	n.d	n.d	n.d
	H3	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d

Fermentación *in vitro* de OL y generación de metabolitos.

Comp ( $\mu$ M)	Muestra fecal	Tiempo de incubación (h)					
		0	2	6	12	24	48
<b>OL</b>	H1	71.57	43.30	14.72	0.16	0.11	0.03
	H2	53.31	37.38	0.84	0.16	0.20	0.01
	H3	62.28	5.54	n.d.	n.d.	0.02	0.02
OHT	H1	3.32	11.27	14.64	20.09	33.21	36.71
	H2	36.84	15.80	19.84	25.43	30.50	29.08
	H3	23.65	10.14	15.51	12.56	20.58	21.81
OHT-ac	H1	3.31	n.d.	7.60	5.66	5.77	6.41
	H2	n.d.	6.28	7.60	7.47	6.04	3.56
	H3	n.d.	8.38	11.21	8.66	7.81	8.35
3,4-EDA	H1	0.46	1.35	0.40	n.d.	0.25	n.d.
	H2	3.26	1.27	0.03	n.d.	n.d.	n.d.
	H3	2.73	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
EA	H1	1.08	1.20	1.04	n.d.	n.d.	0.34
	H2	1.68	1.32	1.03	n.d.	n.d.	0.00
	H3	1.61	1.24	1.01	n.d.	n.d.	n.d.
di-OHPPA	H1	n.d.	n.d.	0.03	0.38	0.54	1.75
	H2	n.d.	0.04	n.d.	0.10	0.57	0.83
	H3	0.09	0.01	0.79	0.10	0.07	0.16
3-OHPPA	H1	9.73	0.13	1.21	2.79	0.44	25.14
3-OHPPA	H2	n.d.	n.d.	6.35	0.83	2.24	0.43
OHPPA	H3	26.84	n.d.	n.d.	1.36	n.d.	5.26
<i>p</i> -CMA	H1	0.11	1.48	2.36	n.d.	n.d.	n.d.
	H2	3.01	3.50	3.77	1.67	0.01	0.00
	H3	1.54	1.26	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PCA	H1	0.18	0.40	0.44	0.16	0.20	1.17
	H2	0.41	0.33	0.38	0.28	0.26	0.03
	H3	16.78	0.35	0.47	0.27	0.31	0.36
<i>m</i> -OHPAA	H1	n.d.	n.d.	0.10	n.d.	0.73	1.37
	H2	0.34	n.d.	0.42	n.d.	n.d.	n.d.
	H3	n.d.	n.d.	n.d.	0.68	0.40	1.98
<i>p</i> -BA	H1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	Tr
	H2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	H3	n.d.	n.d.	n.d.	Tr	n.d.	Tr

Fermentación *in vitro* de TYR y generación de metabolitos.

Comp ( $\mu$ M)	Muestra Fecal	Tiempo de incubación					
		0	2	6	12	24	48
TYR	H1	337.04	309.33	282.63	279.35	274.24	254.91
	H2	332.31	307.98	313.83	287.23	234.98	210.45
	H3	435.91	413.04	351.23	365.61	351.04	329.32
OHT	H1	0.90	0.93	1.01	1.02	0.89	0.72
	H2	0.82	0.85	1.03	1.03	0.82	0.76
	H3	1.22	1.29	1.26	1.40	1.39	1.09
<i>p</i> -OHPAA	H1	n.d.	0.01	4.13	1.40	20.57	16.06
	H2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1.99	0.23
	H3	n.d.	0.47	0.71	0.40	n.d.	14.39